

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-078723

(43)Date of publication of application : 19.03.2002

(51)Int.Cl.

A61F 2/14
A61F 9/007
A61L 27/00
C12N 5/06

(21)Application number : 2000-273839

(71)Applicant : HOYA HEALTHCARE CORP
MIYATA KAZUNORI

(22)Date of filing : 08.09.2000

(72)Inventor : OSAKABE YASUHIRO
MIYATA KAZUNORI

(54) METHOD OF REBUILDING CORNEA

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To rebuild the cornea lacking endothelial cells by culturing the cornea endothelial cells under specified culture conditions.

SOLUTION: This method of substantially rebuilding the cornea comprises building the cornea endothelial cell layers by inoculating the cultured cornea endothelial cells on the substantial segment of the cornea from which the endothelial cells are removed.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-78723
(P2002-78723A)

(43) 公開日 平成14年3月19日 (2002.3.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト*(参考)
A 6 1 F 2/14		A 6 1 F 2/14	4 B 0 6 5
9/007		A 6 1 L 27/00	D 4 C 0 8 1
A 6 1 L 27/00		A 6 1 F 9/00	5 9 0 4 C 0 9 7
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2000-273839(P2000-273839)

(22) 出願日 平成12年9月8日(2000.9.8)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年3月10日
社団法人日本病理学会発行の「日本病理学会会誌第89巻
第1号」に発表

(71) 出願人 597168549

ホーヤ・ヘルスケア株式会社
東京都新宿区西新宿6丁目5番1号

(71) 出願人 500422274

宮田 和典
宮崎県都城市蔵原町6街区3

(72) 発明者 刑部 安弘

東京都新宿区西新宿6丁目5番1号 ホー
ヤ・ヘルスケア株式会社内

(72) 発明者 宮田 和典

宮崎県都城市蔵原町6街区3

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 角膜の再構築方法

(57) 【要約】

【課題】 角膜の再構築方法の提供。

【解決手段】 内皮細胞を除去した角膜実質部分上で、
培養角膜内皮細胞を播種し、実質上に角膜内皮細胞層を
構築することを特徴とする角膜の再構築方法。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 内皮細胞を除去した角膜実質部分上で、培養角膜内皮細胞を播種し、実質上に角膜内皮細胞層を構築することを特徴とする角膜の再構築方法。

【請求項2】 角膜内皮細胞が継代されたものである請求項1記載の再構築方法。

【請求項3】 継代が2～10代である請求項2記載の再構築方法。

【請求項4】 角膜内皮細胞の培養が、6000個/mm²角膜～60000個/mm²角膜の細胞密度で行われるものである請求項1～3のいずれかに記載の再構築方法。

【請求項5】 角膜内皮細胞の培養が、37℃、10%CO₂の条件で行われるものである請求項1～4のいずれかに記載の再構築方法。

【請求項6】 構築が、低グルコース濃度の培地にウシ胎児血清、成長因子及びヒアルロン酸を含有する細胞培養液を用いて培養することにより行われるものである請求項1～5のいずれかに記載の再構築方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、角膜の再構築方法に関する。

【0002】

【従来の技術】角膜移植を、患者の必要に応じて行うためには角膜の保存が必要である。図1において、角膜1は複数の層状構造を形成しており、角膜上皮2、ボーマン膜3、角膜実質4、デスメ膜5及び角膜内皮細胞6から構成されている。長期間角膜を保存しておく、角膜上皮層の脱落、実質の浮腫、内皮細胞の脱落が起こってしまう。しかし、角膜上皮細胞及び実質細胞には再生能力があるため問題視されない事が多い。一方、角膜の透明性の維持に関し最も重要な役割を果たしている角膜内皮細胞は、生体内（人体内）で、ほとんど増殖、再生しないとされているので、角膜は長期保存できない。このように、角膜内皮細胞は、その生体内での増殖能が極めて低い点に問題がある。しかも、角膜内皮細胞が損傷を受けると、損傷部分は増殖した細胞によって埋めることができず、創傷治癒機転は細胞の伸展移動と代償的拡大により細胞の表面積を大きくして隙間を埋めようとする。その結果、角膜内皮細胞の単位面積当たりの密度が減少する。

【0003】従って、角膜内皮細胞の表面積を増やして創傷を治癒させた場合は、角膜の機能には自ずと限界が生じ、破綻すると水泡性角膜症などの疾患を引き起こすこととなる。これらのことより、角膜を長期保存することは、角膜内皮細胞の細胞増殖能が低いことに起因した問題点を生じさせていた。そこで、これらの問題を解決すれば、角膜移植を長期保存でき、必要に応じて移植を行うことができる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、生体内で増殖再生しない角膜内皮細胞を、生体外で増殖させて冷凍保存し、その培養内皮細胞と長期保存していた角膜を、必要性に応じて用いることにより移植用角膜片を制作する角膜の再構築方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、一定培養条件下で角膜内皮細胞を培養することにより、内皮細胞が欠損した角膜を再構築することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、内皮細胞を除去、もしくは脱落した角膜実質部分上で、培養角膜内皮細胞を播種し、実質上に角膜内皮細胞層を構築することを特徴とする角膜の再構築方法である。角膜内皮細胞は、継代されたもの（例えば2～10代）が挙げられる。また、角膜内皮細胞の角膜実質上での培養は、6000個/mm²～60000個/mm²の細胞密度で、そして37℃、10%CO₂の条件で行われる。さらに、角膜内皮細胞層の構築は、低グルコース濃度の培地にウシ胎児血清、成長因子及びヒアルロン酸を含有する細胞培養液を用いて培養することにより行われる。以下、本発明を詳細に説明する。

【0007】

【発明の実施の形態】ヒトの角膜内皮細胞は角膜の透明性を維持する機能を有しており、その透明性を保つためには、500cells/mm²以上の細胞密度が必要である。また、前述の通り角膜内皮細胞が抱える最大の問題点は生体内での細胞増殖能に乏しいことである。

【0008】そこで、本発明では、生体外の所定の培養条件で内皮細胞を培養増殖させ、本来の角膜内皮を除去した角膜実質上に培養角膜内皮細胞を播種し、角膜内皮細胞層を再構築するというものである。長期保存された角膜であっても、内皮細胞の再構築を行えば角膜移植に使用出来る可能性がある。

【0009】1. 角膜の調製

再構築の対象となる角膜（角膜実質）は、高齢者、長期コンタクト装用者、内眼手術の既往があるなどの理由で角膜内皮細胞数が不十分なもの、又は移植手術機会をのがし長期保存したものを使用することができる。あるいは、眼球銀行などから入手してもよい。

【0010】角膜にはもとの内皮細胞が残存するため、その残存する角膜内皮細胞を予め除去する。角膜内皮細胞の除去は、強角膜片（角膜周囲に強膜を数mm残したものの）上に蒸留水等の水溶液を滴下し、1分程度放置して細胞を除去し易くした後、綿棒などでデスメ（Descemet）膜上を軽く拭いて行う。その後内皮細胞を除去した角膜をデスメ膜側を上方に向けて静置する。角膜の長期保存に関しては、内皮細胞の再構築を行うまでは、冷凍保存（-150℃以下の超低温冷蔵庫もしくは液体窒素内）しておくことが好ましい。

【0011】2. 角膜内皮細胞の調製

一方、角膜上に内皮細胞層を再構築するための角膜内皮細胞（例えば、ヒト角膜内皮細胞）は、「1. 角膜の調製」の項に記載の角膜とは別に、角膜移植に使用された残りの角膜片などから採取して初代培養を行い、続いて継代培養して角膜に播種するために必要な量に増殖させる。増殖後は、角膜に播種するまで冷凍保存（-150℃以下の超低温冷蔵庫もしくは液体窒素内）しておく。

【0012】角膜内皮細胞の採取法は、デスメ膜と共に採取し初代培養を開始する。角膜内皮細胞をデスメ膜ごと採取するための方法は、無菌下、実体顕微鏡下にてメスまたは鋭利なピンセットで機械的に切除する方法、スパーテルやシリコンラバー等で機械的に剥ぎ取る方法、ペプシンやEDTA等の薬剤を用いた方法が挙げられる。本発明において細胞に化学的損傷を与えずに採取できる点で、デスメ膜ごと機械的に切除する方法が好ましい。角膜から切除した内皮細胞付きデスメ膜（図2(h)）を細胞皿上に移し、一昼夜程度静置しておく（図2(d)）、デスメ膜から細胞皿上に内皮細胞が伸展、増殖してくる（図2(e)）。この際に、細胞皿上にはフィブロネクチン等の接着因子や細胞外基質（ECM）をコーティングしておく（図2(c)）と当該角膜内皮細胞を効率よく増殖させることができる（図2(c)）。なお、仔牛の角膜内皮細胞が形成したECM（図2(a)、(b)）が、最も効率良く当該細胞を増殖させる点で好ましい。

【0013】初代培養及び継代培養に使用する細胞培養液としては、動物細胞の培養に一般的に使用されるD-MEM、MEM等が挙げられ、低グルコース濃度（Low Glucose）の培地（D-MEM等）にウシ胎児血清（FBS）10～15%、成長因子等を含有することが好ましい。ここで、培地に含有させるグルコース濃度は、通常のグルコース濃度よりも低濃度であり、2.0 g/L 以下、例えば0.1～2.0 g/L、好ましくは0.1～1.0 g/Lである。また、成長因子としてはB細胞増殖因子（BCGF）、上皮成長因子（EGF）、組換えEGF（rEGF）、繊維芽細胞増殖因子（FCF）が挙げられ、1つ又は複数の因子を適宜組み合わせる培地に含有させることができる。これらの成長因子の含有濃度は、1～5 ng/ml、好ましくは1～2 ng/mlである。さらに、上記培地組成に加えて、必要に応じてドキシサイクリン（doxycycline）等の防腐剤、ファンギゾン（Fungizone）等の防カビ剤を添加することもできる。

【0014】培養温度は35～38℃、好ましくは37℃である。そして、90～100%湿潤（好ましくは100%湿潤）、5～10%CO₂（好ましくは10%CO₂）のインキュベータ内で培養する。細胞が集密になった段階（定常状態7～10日後）で継代する。継代は、細胞増殖の状態を観察しながら適宜行うが、2回～10回程度継代するとよい。このようにして得られた細胞を角膜上での培養まで冷凍保存しておく。

【0015】3. 角膜内皮細胞の播種及び培養

角膜内皮細胞層を実質上に構築するには、角膜への角膜内皮細胞の播種を行い、所定の培養を行う。すなわち、長期冷凍しておいた角膜を解凍し、正常内皮細胞を除去する。その角膜上に、解凍後さらに継代培養した培養角膜内皮細胞を含有する培養液を一定量滴下し、培養する（図2(f)）。なお、継代培養は、2～10回程度行う。

【0016】培養温度、CO₂濃度等の培養条件は、前記と同様である。この際使用する培養液は、前記と同様の性状のものに、1.0～3.0%程度、好ましくは1.0～2.0%のヒアルロン酸（ヒアルロン酸ナトリウム）を添加すると、角膜実質の膨潤を防いで角膜浮腫等の破壊を防止することが出来る。また、滴下する細胞数は正常内皮細胞密度（3000cells/mm²）の2倍以上が好ましく、2倍（6000cells/mm²）～10倍（60000cells/mm²）がさらに好ましい。角膜は、デスメ膜側が上方を向いた配置となっているので、滴下された角膜内皮細胞は底面（つまりデスメ膜上）に速やかに接着し、3時間培養後には、細胞間接着装置の形成を観察することができる。24時間培養後には、角膜内皮細胞はデスメ膜上に十分伸展し、ほぼ1層の角膜内皮細胞層を形成する（図2(g)）。この際実質につまりデスメ膜上にヒトフィブロネクチン等の接着因子を結合させておく（図2(c)）と内皮細胞の接着効率が上昇するので望ましい。

【0017】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】 角膜内皮細胞層の再構築実験

1. 方法

(1) 角膜として、-152℃で長期保存された強角膜片を使用した。凍結保存強角膜を37℃の孵卵器内で解凍した。次に、角膜内皮側に蒸留水を滴下して1分間放置した後、綿棒を用いて正常（残存）内皮細胞を除去した。

【0018】(2) 角膜内皮細胞は、全層角膜移植手術使用後の強角膜片からデスメ膜ごと採取し、初代培養を行った。培養は、15%FBS添加D-MEMを用い、100%湿潤、10%CO₂存在下で行った。定常状態になった培養内皮細胞を細胞皿より剥離し3継代培養し、凍結保存した（保存細胞）。保存細胞を2継代培養し、(1)により得られた角膜に10⁶個播種した。角膜内皮細胞を播種してから0.5、3、24、48時間後に角膜を経時的に固定した。

(3) 以上の通り得られた角膜標本を、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡に供し、組織学的に観察を行った。

【0019】2. 結果

(1) 解凍直後の強角膜片（図3a、b）表層角膜上皮及び内皮細胞は脱落していたが、角膜上皮基底層、実質は良好な状態であった。

図3a：HE染色、対物10倍

図3b：HE染色、対物20倍（図3aの内皮側の強拡大）

【0020】(2) 角膜内皮細胞 (HCEC) の接着状態
0.5時間後：HCECはデスメ膜上に接着していたが、重層化も観察された (図4a、図5a)。それらは細胞小器官が発達しており、細胞突起が出現している細胞もあった (図4b)。また、実質細胞は正常であった (図5b)。

【0021】

図4a：HE染色、対物20倍

図4b：透過型電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは2 μm

図5a：走査電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは50 μm

図5b：透過型電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは10 μm

3時間後：HCECは伸展し、角膜内皮細胞層様構造を形成し始めているが (図6a、b)、依然丘状を呈している細胞も観察された (図7a)。

【0022】

図6a：HE染色、対物20倍

図6b：透過型電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは1 μm

図7a：走査電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは50 μm

図7b：透過型電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは1 μm

24時間後：HCECは伸展し平坦化しているが (図8a、b)、細胞の端が重なり合っている細胞も観察された (図8b、図9a)。

【0023】

図8a：HE染色、対物20倍

図8b：透過型電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは1 μm

図9a：走査電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは50 μm

図9b：透過型電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは2 μm

48時間後：HCECはさらに平坦化し、多角形状を呈している (図10a-b、図11a)。細胞間では密着結合 (tight junction) 様接着装置も形成されていた (図10b)。

【0024】

図10a：HE染色、対物20倍

図10b：透過型電子顕微鏡像、上パネルのバー (一) のスケールは1 μm 、下パネルのバー (一) のスケールは20 nm

図11a：走査電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは50

μm

図11b：透過型電子顕微鏡像、バー (一) のスケールは2 μm

【0025】(3) 角膜実質

0.5時間後：コラーゲンの層構造、実質細胞の形態はほぼ保たれていた (図5b)。

3時間後：コラーゲンの層構造、実質細胞の形態はほぼ保たれていた (図7b)。

24時間後：コラーゲンの層構造、実質細胞の形態はほぼ保たれていた (図9b)。

48時間後：実質細胞、コラーゲンの層構造はほぼ保たれていた (図11b)。

以上より、再構築された角膜内皮細胞層は組織学的に正常内皮細胞層様でありその機能も保っているように考えられた。

【0026】〔実施例2〕 培養ヒト角膜内皮細胞 (HCEC) の細胞動態実験

1. 方法

本実施例では、生体外において増殖が確認された培養角膜内皮細胞が、再度角膜上に戻ったとき、その細胞動態はどのように変化するかを確認することを目的として、HCECの細胞動態実験を行った。細胞動態の指標には、細胞周期に最も関連のあるサイクリンを用いた。サイクリンの発現と細胞周期との関係を図12に示す。通常、ヒトの角膜内皮細胞は生体内ではG1期で停止しており、分裂はほとんど確認されない。

【0027】実施例1と同様の操作を行い、角膜から残存の内皮細胞を除去した。次に、7継代目のHCECを細胞間で接着阻害を受けない個数 (5×10^4 個程度) で角膜に播種し、培養を行った。なお、培養条件は実施例1と同様であるが、培養液にはその影響 (ヒアルロン酸ナトリウムにより細胞分裂抑制の可能性) を考えヒアルロン酸ナトリウムは添加しなかった。培養12、15、18、21、24時間毎に、20%中性緩衝ホルマリンで固定を行い、ABC法を用いてサイクリンを検出した。サイクリン陽性判定基準は以下の通りである。

- ＋：1視野に陽性細胞が複数個観察されるもの
- ±：全視野で陽性細胞が1～2個観察されるもの
- －：全視野で陽性細胞が全く観察されないもの

2. 結果

細胞動態の結果を図12及び表1に示す。

【0028】

【表1】

	サイクリン A	サイクリン B1	サイクリン D1	サイクリン E
12 時間	±	－	＋	±
15 時間	－	－	＋	±
18 時間	－	－	＋	－
21 時間	－	－	＋	－
24 時間	－	±	＋	±

【0029】培養24時間までは、サイクリンD1が優位に陽性であることから、HCECの細胞周期は変化せずに、G1期で停止したままであると考えられた。以上より、培養ヒト角膜内皮細胞は、実質上では生体内と同様に分裂は確認されず、生体内と同様の細胞動態を示していた。

【0030】

【発明の効果】本発明により角膜の再構築方法が提供される。本発明によれば、角膜移植用の角膜移植片の長期保存が可能であるため、角膜移植の定時化が示唆される。

【図面の簡単な説明】

【図1】角膜の模式図である。

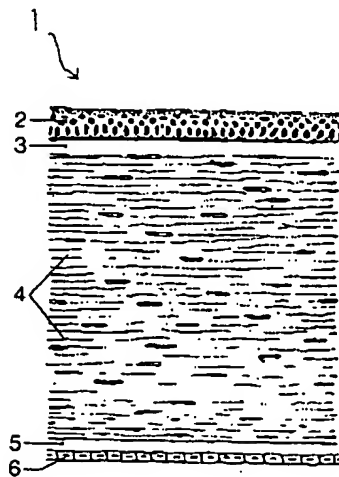
【図2】本発明の再構築方法の概要を示す図である。

【図3】解凍直後の強角膜片を示す写真である。

【図4】角膜内皮細胞の角膜への接着状態を示す写真である（0.5時間後）。

【図5】角膜内皮細胞の角膜への接着状態を示す写真である（0.5時間後）。

【図1】



【図6】角膜内皮細胞の角膜への接着状態を示す写真である（3時間後）。

【図7】角膜内皮細胞の角膜への接着状態を示す写真である（3時間後）。

【図8】角膜内皮細胞の角膜への接着状態を示す写真である（24時間後）。

【図9】角膜内皮細胞の角膜への接着状態を示す写真である（24時間後）。

【図10】角膜内皮細胞の角膜への接着状態を示す写真である。

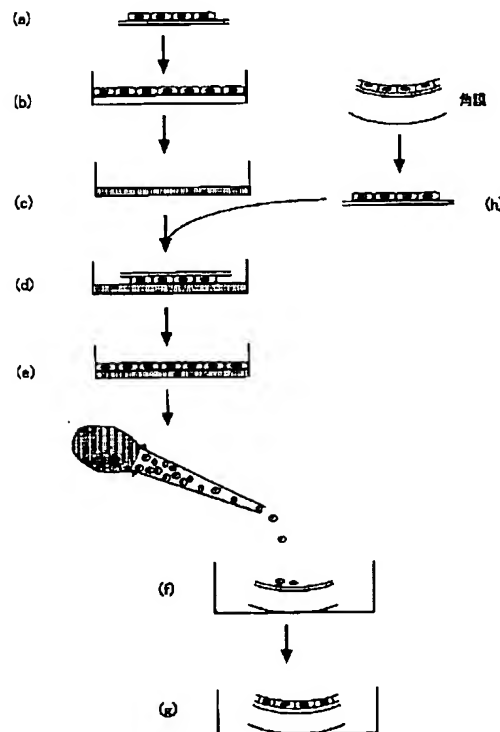
【図11】角膜内皮細胞の角膜への接着状態を示す写真である。

【図12】サイクリンの発現と細胞周期との関係を示す図である。

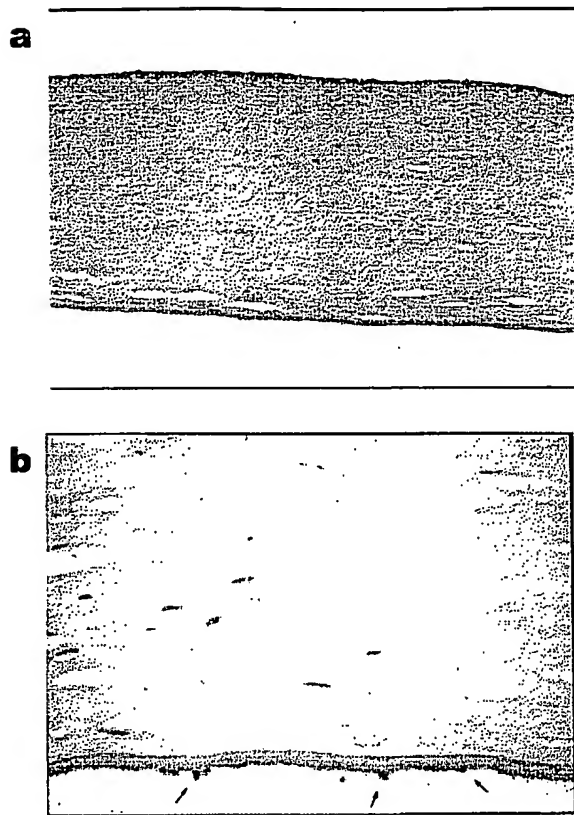
【符号の説明】

1：角膜 2：角膜上皮 3：ボーマン膜 4：角膜実質 5：デスメ膜 6：角膜内皮細胞

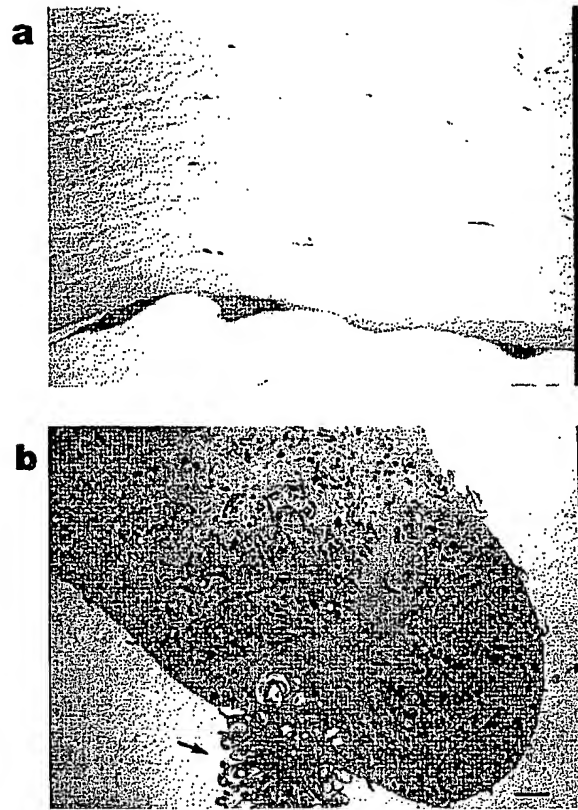
【図2】



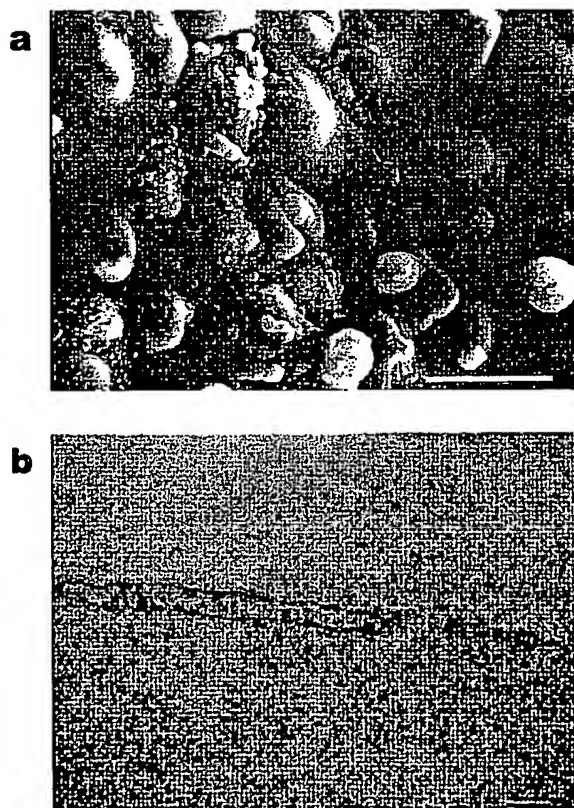
【図3】



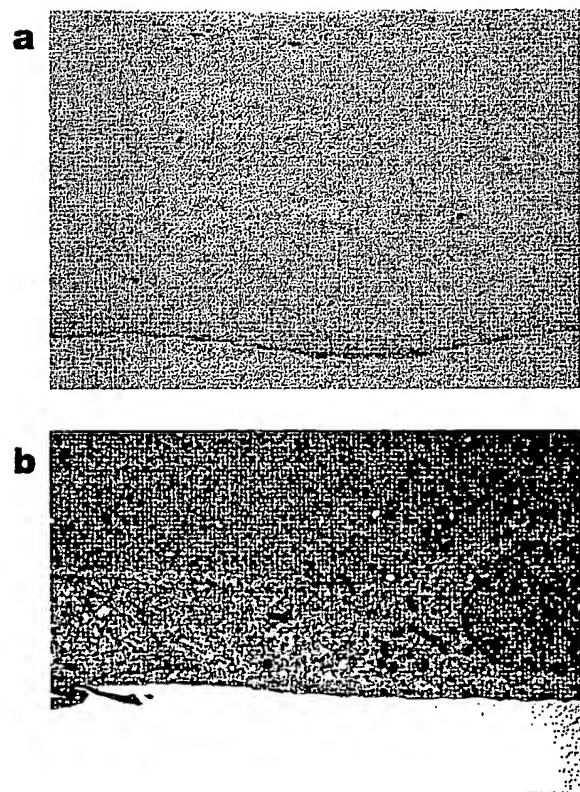
【図4】



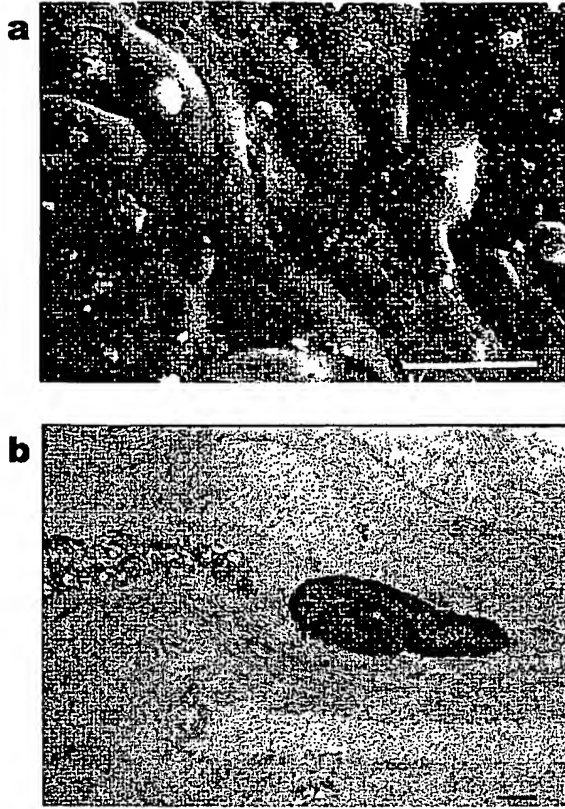
【図5】



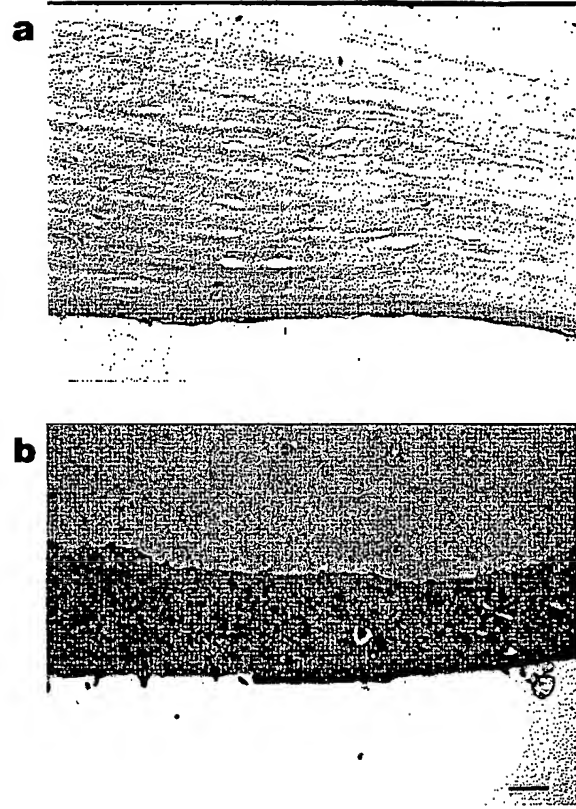
【図6】



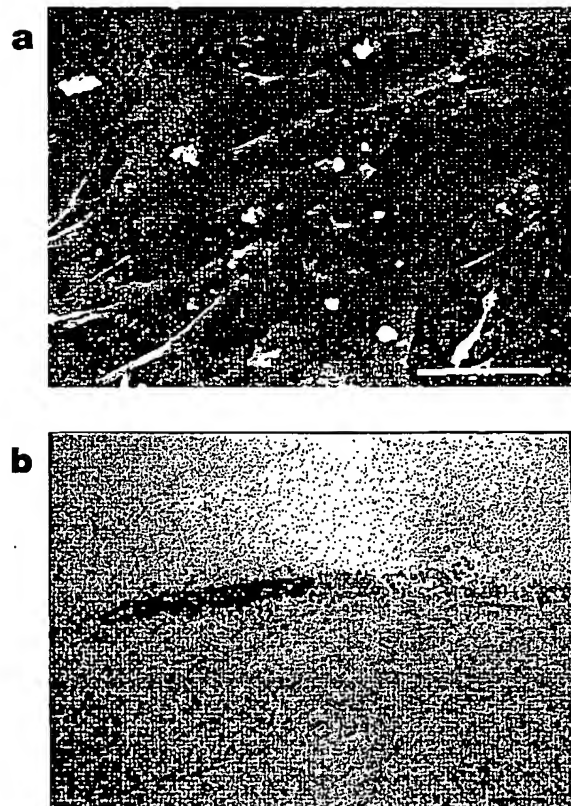
【図7】



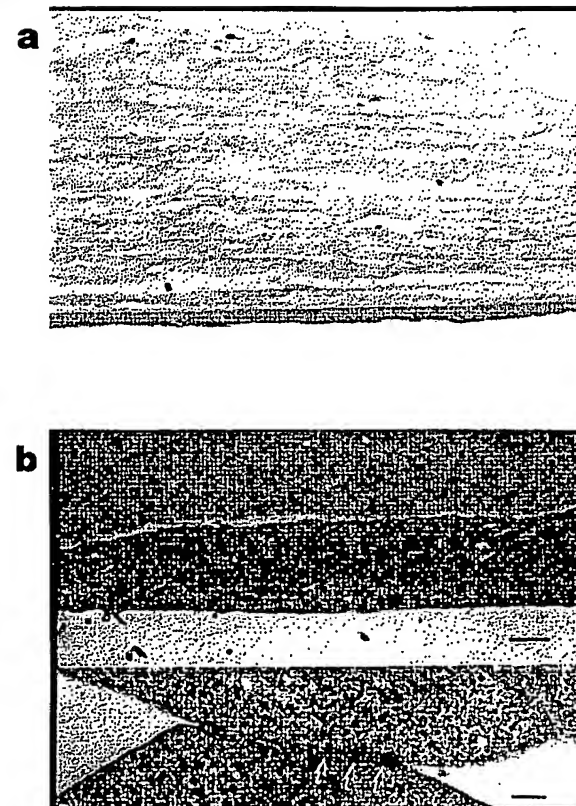
【図8】



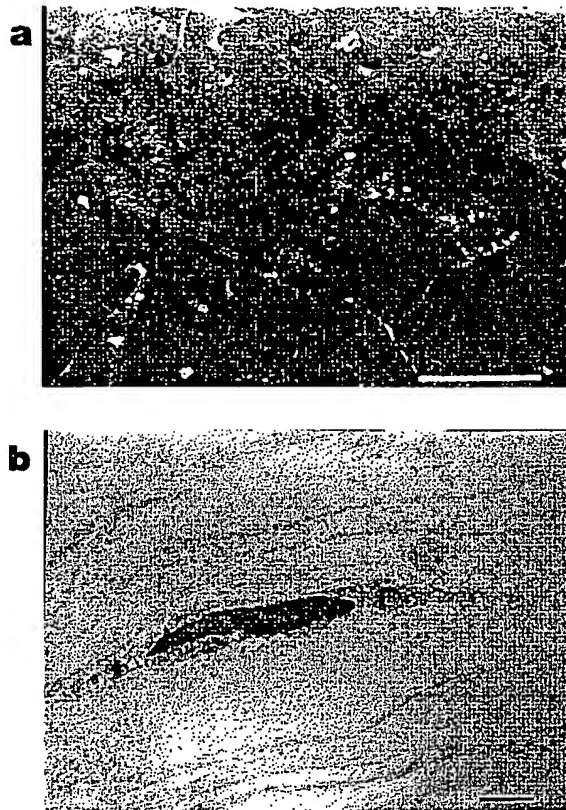
【図9】



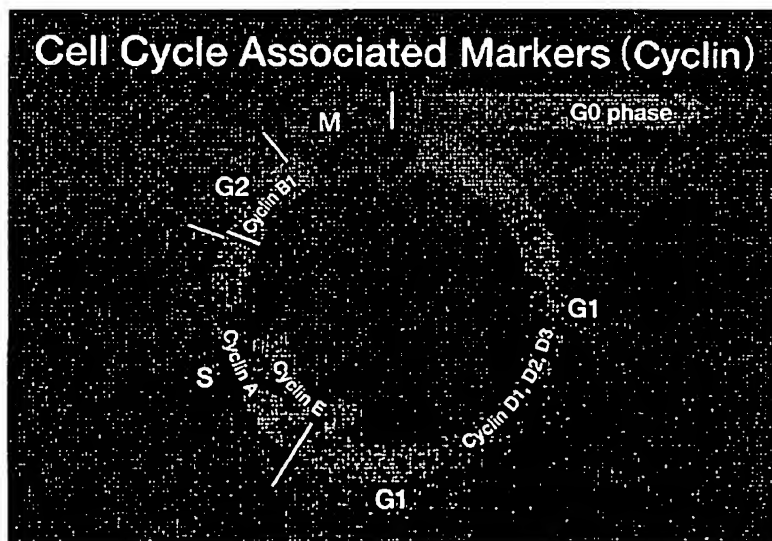
【図10】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B065 AA93X BC37 BC41 CA24
CA44
4C081 AB21 BA13 CD34 DA05 EA11
EA12
4C097 SA10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.